

VRSTE RODA *PHYTOPHTHORA* NA BUKVI I TOPOLAMA U HRVATSKOJ*PHYTOPHTHORA* SPECIES ON BEECH AND POPLARS IN CROATIA

Milan PERNEK*, Miljenko ŽUPANIĆ*, Danko DIMINIĆ**, Thomas CECHE***

SAŽETAK: Rod *Phytophthora* čine pseudogljive koje parazitiraju velik broj vrsta drvenastog i zeljastog bilja. Uzrokuju odumiranje korijena i kore, što je često povezano s klimatskim ekstremima. S obzirom na važnost problema u svijetu te potencijalne opasnosti za hrvatsko šumarstvo, cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost vrsta roda *Phytophthora* u Hrvatskoj i procijeniti kolika je opasnost za njihovo širenje. Istraživanja su obavljena na bukvi u području UŠP Bjelovar i klonovima euroameričkih topola na području UŠP Osijek.

Na bukvi je nađena *P. cambivora*, a na topolama *P. cambivora* i *P. ganopodides*. Pojava *P. cambivora* na bukvi vezana je uz klimatska odstupanja od prosjeka izmjenom ekstremnog sušnog i vlažnog razdoblja. Kod topola je od nađenih vrsta *Phytophthora* ponajprije stradao klon 275/81, također kao posljedica klimatskih odstupanja.

KLjučne riječi: *Phytophthora*, trulež korijena, bukva, topola

UVOD – Introduction

Vrste iz roda *Phytophthora* primarni su paraziti finog korijena i kore biljaka te uzročnici truljenja čitavog korijenovog sustava. Vrste iz ovoga roda poznati su patogeni bilja u agronomiji, arborikulturi i šumarstvu (Erwin i Ribero 1996). Danas je poznat velik broj vrsta iz roda *Phytophthora* koje parazitiraju stotinjak različitih vrsta drvenastog bilja, pa se posljednjih 20-tak godina ubrajaju u značajnije uzročnike biljnih bolesti i u šumarstvu. Iako ih mnogi ubrajaju u gljive (*Eumycota*) i tradicionalno ih istražuju mikolozi, *Phytophthora* vrste spadaju u *Oomycota*, pseudogljive filogenetski bliže algama (Hawksworth i sur. 1995, Belbahri i sur. 2006).

Dosadašnja istraživanja pokazuju povezanost odumiranja korijenja, uzrokovanih napadima *Phytophthora* vrsta i klimatskih ekstrema. Ta veza je ključna, jer kada su klimatski čimbenici nepovoljni po domaćina,

dolazi do sinergističkog učinka dodatnih negativnih čimbenika, pri čemu šume propadaju (Brasier 1993, Brasier i sur. 1993, Brasier 1999). U Europi su provedena opširna istraživanja patogena iz roda *Phytophthora*, a istraživane su ponajprije vrste koje narušavaju stabilnost prirodnih šumskih ekosustava (Jung i Blaschke 1995, Jung i sur. 1999, Jung i sur. 2000, Jung i sur. 2002). U posljednje vrijeme intenzivno se istražuju nove vrste, koje se opisuju kao opasni karantenski organizmi (Jung i sur. 2003). Oni su posebice opasni, jer se domaće vrste drveća nisu na njih prilagodile i nemaju razvijen adekvatan obrambeni sustav.

Spore *Phytophthora* vrsta mogu u tlu preživjeti više godina, čekajući optimalne uvjete za klijanje (visoka vlaga, temperatura viša od 10 °C). Klijanjem se formiraju zoosporangiji iz kojih izlaze zoospore, koje se aktivno, kemotaktički kreću prema finom korijenju kojega inficiraju. Kada uđu u stanice korijenja, hife se šire u svim smjerovima. Nakon što iscrpe hranjiva, formiraju trajne spore koje raspadanjem drvnog materijala ponovno ulaze u tlo i ciklus se ponavlja. Bolest se obično razvija duži niz godina, ali ga čimbenici poput pojačane vlažnosti tla (plavljenje, jake kiše, stajaća voda) značajno ubrzavaju. Većina vrsta iz roda *Phytophthora* žive i prenose se preko vode u tlu, a samo je mali udio vrsta koje se prenose zrakom. Glede specifičnog životnog

* Dr. sc. Milan Pernek (milanp@sumins.hr)* Mr. sc. Miljenko Županić (zupanicm@sumins.hr)
Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko** Prof. dr. sc. Danko Diminić (diminic@sumfak.hr)
Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb*** Dr. sc. Thomas Cech (thomas.cech@bfw.gv.at)
Bundesforschungs- & Ausbildungszentrum für Wald,
Naturgefahren & Landschaft (BFW), Seckendorff-
Gudent-Weg 8, Beč, Austrija

ciklusa *Phytophthora* spp. koji se odvija u tlu, velika je vjerojatnost da se bolest ne prepozna, odnosno da se naseljavanjem sekundarnih patogena krivo determinira uzročnik odumiranja stabla.

Vrste iz roda *Phytophthora* stvaraju toksine, zbog čega dolazi do odumiranja korijena i kore. Posljedice su tipični simptomi napada: tekline iz debla, prorijeđenost krošnje, povećanje udjela mrtvih grana, izostajanje postranih izbojaka, te formiranje bičastog oblika grane. Nakon toga list se smanji, pojedini dijelovi krošnje se suše, fotosinteza se značajno smanjuje, a vitalitet domaćina naglo opada. U konačnici dolazi do propadanja čitave krošnje, odnosno do odumiranja stabla.

O uzročnicima biljnih bolesti iz roda *Phytophthora* nema puno podataka u domaćoj literaturi, a intenzivna istraživanja u svijetu počinju sredinom 90-tih godina 20. stoljeća, posebice posljednjih 15 godina. Upravo tada je opisano većina danas poznatih vrsta (Cook i sur. 1996, Jung i sur. 1996, Cook i sur. 1997, Cook i sur. 2000, Denman i sur. 2005, Denman i sur. 2006, Belbahri i sur. 2006).

U svijetu je poznat problem sušenja velikog broja stabala na većim površinama, kao primjerice plantaže vrsta roda *Eucalyptus* u Australiji ("Jarrah dieback") (Weste i Marks 1987) ili hrastova u SAD-u, kojega radi naglih pojava simptoma napada i brzog usmrćivanja zovu engleskim pseudonimom "sudden oak death" (Rizzo i sur. 2002). U Europi su problemi ipak za sada manjeg obima, ali postoje izolirani slučajevi s opisanim jačim sušenjima johe i bukve (Brasier i sur. 1993, 2004, Jung i sur. 2000).

S obzirom da je problem pseudogljiva *Phytophthora* u svijetu prepoznat kao vrlo važan, te da su potencijalno opasne za hrvatsko šumarstvo, javila se potreba istraživanja prisutnosti vrsta u Hrvatskoj.

Cilj ovoga istraživanja je utvrditi prisutnost vrsta roda *Phytophthora* na najosjetljivijim vrstama drveća bukvi i topoli u Hrvatskoj te procijeniti kolika je opasnost njihova širenja.

MATERIJALI I METODE RADA – *Materials and methods*

Istraživanja vrsta roda *Phytophthora* obavljena su na području triju Uprava šuma podružnica (UŠP): Bjelovar i Osijek (Tablica 1). U Bjelovaru je istraživana prisutnost i pojava *Phytophthora* vrsta na bukvi (*Fagus*

sylvatica L.), a u Osijeku na klonovima euroameričkih topola (*Populus x euroamericana*). Područja istraživanja odabrana su prema pojavi tipičnih simptoma bolesti.

Tablica 1. Lokaliteta istraživanja *Phytophthora* spp. s datumom uzimanja uzoraka

Table 1. *Phytophthora* spp. research sites with dates of sampling

Uprava šuma <i>District Forest</i>	Šumarija <i>Forest Office</i>	Gospodarska jedinica <i>Management Unit</i>	Odjel/ Odsjek <i>Unit No.</i>	Koordinate <i>Coordinate</i>	Napadnuta vrsta <i>Host</i>	Sastav sastojine <i>Type of a forest</i>	Datum sakup. uzoraka <i>Date of sampling</i>	Broj uzoraka <i>Sample No.</i>	Hranj. podloga <i>Medium</i>	Šifre uzoraka <i>Samples code</i>
Osijek	Valpovo	Valpovačke poddravske šume	25b	45°34'38"S 18°36'08"E	Topola <i>Poplar</i>	Kultura <i>Plantation</i>	13.06.2005. 25.05.2006.	21 50	PDA PDA	OV-1-(1-21) OV-2-(1-50)
	Osijek	Osječke poddravske šume	7k	45°40'44"S 18°27'01"E			04.07.2006. 08.02.2007.	4 10	PDA PDA	OO-1-(1-4) OO-2-(1-10)
Bjelovar	Bjelovar	Bjelovarska Bilogora	41b	45°58'15"S 16°58'04"E	Bukva <i>Beech</i>	Mješovita sastojina bukve, graba i kitnjaka <i>Mixed stand of beech, oak and hornbeam</i>	06.06.2008. 29.05.2008. 30.07.2008. 17.09.2008. 28.06.2009.	2 2 1 2 1	Mrkva V8 PDA V8 PDA	B41b-1 B41b-2 B41b-3 B41b-4 B41b-5 B41b-6 B41b-7 B41b-8

Terenski obilasci i uzimanje uzoraka

Tijekom terenskih obilazaka utvrđivano je zdravstveno stanje napadnutih sastojina, a uzorci su se sakupljali u određenim datumima (Tablica 1) i to isključivo sa stabala s jasnim simptomima napada: tekline na pridanku i deblu (Slika 1). Na mjestu teklina zarezivana je kora, i

tamo gdje su detektirane narančaste jezičaste nekroze uzimani su uzorci (Slike 2 i 3), koji su pakirani u plastične posude s destiliranom vodom. Tako pripremljeni materijal transportiran je u prijenosnim hladnjacima isti dan u laboratorij Hrvatskog šumarskog instituta na daljnju obradu.

Kako se u načelu razlikuju dvije tehnike izolacije: izolacija iz napadnutog tkiva, te izolacija iz uzorka tla s korijenjem, paralelno su uzimani i uzorci tla s sitnim

korijenjem, do 10 cm u dubinu. Broj i datum uzimanja uzoraka naveden je u Tablici 1.



Slika 1. Tekline na deblu bukve
Figure 1 Bleeding on the trunk of beech



Slika 2. Jezičaste nekroze ispod kore bukve
Figure 2 Necrosis under the bark of beech



Slika 3. Jezičaste nekroze ispod kore topole
Figure 3 Necrosis under the bark of poplar

Laboratorijska obrada i izolacija patogena

Dijelovi kore su inokulirani na hranjive podloge (Tablica 1), a precjepljivanjem su izolirani sojevi pseudogljiva koji su morfološki pregledani, te pri sumnji poslani na molekularnu analizu.

Uzorci tla su obrađivani metodom potapanja. Pri tome se posuda s poklopcem zapremnine 1l napunila uzorkom tla do pola, a zatim se do $\frac{3}{4}$ nalila deionizirana voda. Korišteni su različiti mamci koji privlače zoospore. Mamci se stavljaju u posude nakon 3 dana. Prilikom prve izolacije kao mamac je korišten plod kruške, a dalje tijekom projekta ispitana je i mogućnost korištenja ostalih mamaca koji su preporučeni za izolaciju *Phytophthora* vrsta (mlado lišće hrasta lužnjaka, mlado lišće rododendrona - *Rhododendron catawbiense* Michx. 'Cunningham's White' i svježi plod jabeke). Prilikom uzimanja biljnih organa koji služe kao

mamac, važno je da matična biljka nije bila tretirana fungicidima, jer to smanjuje ionako malu uspješnost ove metode. Ukoliko dođe do infekcije na mamcima se razvijaju lezije, s čijih se rubova uzimaju uzorci za daljnji postupak izolacije koji je istovjetan kao i kod postupanja s uzorcima kore i tkiva sa stabala. Ti uzorci su prvo obrađeni površinskom sterilizacijom te su takvi stavljeni na više vrsta hranjivih podloga (PDA, V8). Nakon toga su se izolati u nekoliko navrata precjepljivali, kako bi se dobila čista kultura. Za ove postupke korištena je besprašna komora, kako bi se osigurali sterilni uvjeti. Izolacija uzročnika ovim postupcima daje uspješnost od 10-30 % te je bilo potrebno obraditi velik broj uzoraka kako bi dobili čistu kulturu.

Molekularne analize

Dobiveni izolati čiste kulture poslani su u referentne laboratorije na molekularne analize i determinaciju na razini vrste. Izolati iz Bjelovara poslani su u Hampton Roads Agricultural Research and Extension Center (Virginia, SAD), dok su izolati iz Osijeka poslani u Bundesamt für Forst und Wald u Beč (Austrija).

Izolati su uzimani s kultura te su izravno obrađeni PCR metodom bez ekstrakcije DNK prema metodi Kong i sur. (2005). Na taj način omogućeno je odvajanje više izmiješanih individua, čime je smanjena mogućnost pogreške. Manja količina micelija uzimana je iz jedne kolonije s pipetom i dodana u PCR miksturu za

amplifikaciju. PCR mikstura sastojala se od 10mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 μM ITS-1 početnice, 0,2 mM d NTP i 0,5 dijelova *Taq*DNK polimeraze (TaKaRa Mirus Biocorporation, Madison, SAD) (Kong i sur. 2005). Izravne PCR kolonije su pomoću ITS-1 početnice kombinirane sa SSCP (Kong i sur. 2003, Kong i sur. 2005) i korištene za determinaciju. Za PCR je korištena sljedeća početnica: uzvodno 5'-3' GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG te nizvodno 5'-3' AGCGTTCTTCATCGATGTGC. Broj parova baza iznosio je oko 300.

REZULTATI I RASPRAVA – Results and discussion

Uzroci sušenja stabala i otkrivene vrste iz roda *Phytophthora*

Na izolatima bukve i topola, nakon laboratorijskog razvoja izolata utvrđen je za *Phytophthora* sp. specifičan rast micelija u petrijevim posudicama u laboratorijskim uvjetima (Slika 4.). Izolati su molekularno analizirani te je potvrđena prisutnost vrsta iz roda *Phytophthora*.



Slika 4. Koncentrični rast micelija izoliran sa stabala bukve
Figure 4 Concentric growth of mycelia isolated from beech trees

Phytophthora vrste na topolama

Prvi simptomi primijećeni su na topolama 2005. godine te su uzeti uzorci tla s korijenjem. Nakon laboratorijske obrade metodom potapanja izoliran je micelij, koji je po morfološkim obilježjima upućivao na vrste iz roda *Phytophthora*. Ti uzorci su poslani na molekularne analize te je utvrđeno da se radi o vrstama *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman i *Phytophthora gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman.

Terenskim obilascima utvrđeno je da su prvi simptomi koji ukazuju na zarazu: osutost krošnje, kloroza i otpadanje lišća. Nakon toga u proljeće i ljeto na kori se formiraju tamne mrlje iz kojih se slijeva tamna teklina. Na tim mjestima se ispod kore nalaze rakaste tvorevine, koje obuhvaćaju kambijalno tkivo čime prekidaju provodne elemente u stablu. Često dolazi i do raspucavanja kore od pridanka, i na tim mjestima se ispod kore nalaze crne lise koje sežu i do 7 metara u visinu, prosječne su širine 10 cm mjereno po obodu presjeka stabla i ulaze do 3 cm duboko u drvo. Bolest se širi koncentrično oko napadnutog stabla. Na korijenju napadnutih stabala utvrđene su nekroze, kao i na stablu i granama.

Terenskim pregledom napadnutih odjela utvrđeno je da većina sušenja vezana za klon 275/81.

Utvrđeni uzročnik bolesti *P. cambivora* je kod nas već otprije poznata kao uzročnik tintene bolesti pitomog kestena (Glavaš 1999), dok se u Europi spominje kao uzročnik bolesti i na hrastovima i bukvi, no do sada nije opisivana kao vrsta koja napada topole. O sposobnosti utvrđenog uzročnika da se u povoljnim uvjetima naglo razvije i prouzroči velike štete govori i podatak, da je ova vrsta 20-tih godina prošloga stoljeća uzrokovala epifitociju tintene bolesti pitomog kestena u Italiji, Portugalu i Španjolskoj u kojoj je stradalo mnogo stabala (Brasier 1999).

Vrste iz roda *Phytophthora* većinom su slabi patogeni, ali kod promjena stanišnih uvjeta te narušavanja zdravstvenog stanja i vitaliteta stabala mogu vrlo brzo i ozbiljno ugroziti domaćina. Visoki stupanj prilagodljivosti je osobito opasan kod introdukcije novih vrsta iz udaljenih dijelova svijeta. Utvrđeno je također da vrlo često dolazi do istovremenog napada više vrsta iz ovog roda. Vrste unutar roda *Phytophthora* prilagodljive su različiti-

tim stanišnim uvjetima, a u nekim slučajevima mogu i stvarati međuvrsne hibride (Brasier i sur. 1995).

Iako je utvrđen štetni čimbenik polifagna vrsta, riječko napada više različitih vrsta domaćina na jednom staništu. To potvrđuje i činjenica da je u Hrvatskoj isključivo stradao klon 275/81.

Aluvijalne terase u riječnim dolinama koje su nakon hidromeliorativnih zahvata na vodotocima izgubile prirodni režim plavljenja, postale su pogodna staništa za uzgajanje topola. No, kod podizanja nasada topola, kao i kod ostalih monokulturnih nasada, postoji velik rizik da prilikom pojave pojedinih štetnih biotičkih čimbenika dođe do akutnih epidemija i šteta velikih razmjera.

Nasade je potrebno obnavljati mješovitom sadnjom više klonova, kako bi smanjili mogućnost širenja pojedinih bolesti. Biljne bolesti koje napadaju topole su po najprije sekundarne tj. inficiraju oslabljena ili stabla koja su zbog nepovoljnog djelovanja ostalih štetnih abiotičkih i biotičkih čimbenika izgubila vitalnost.

Pojava patogena na topolama je najvjerojatnije rezultat ekstremno sušnih klimatskih prilika tijekom 2003. godine, te vrlo tople 2004. godine, nakon čega su u 2005. godini uslijedile dugotrajne i višekratne poplave. Sušna razdoblja utjecala su na fiziološko slabljenje stabala, dok su poplave nakon toga pomogle širenju zaraze.

Phytophthora cambivora na bukvi

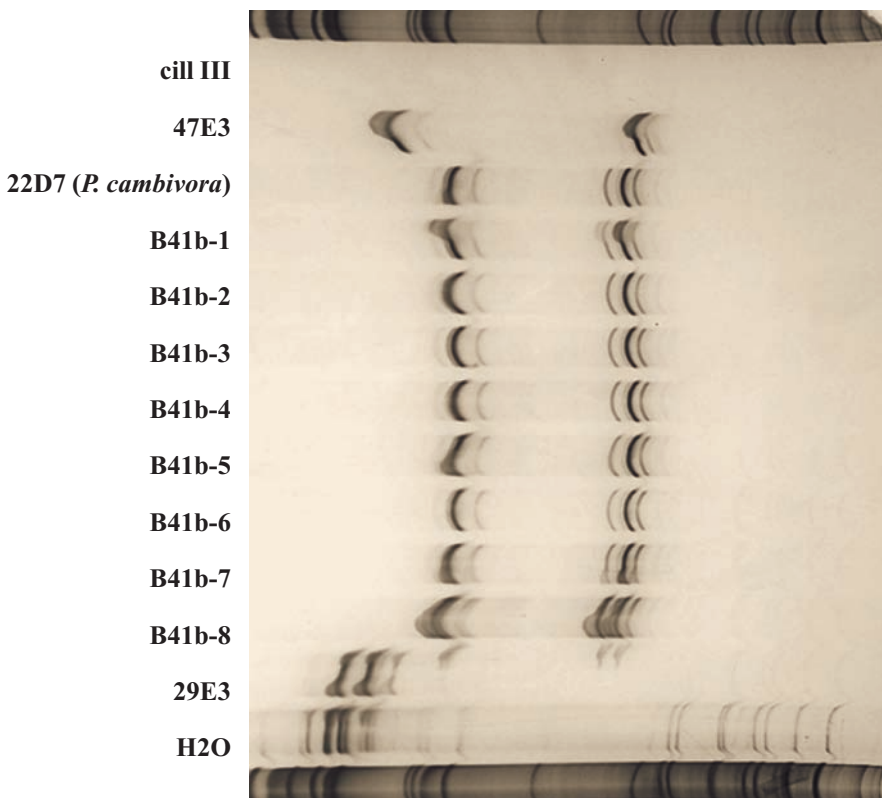
Molekularna analiza uzoraka sa stabala bukve na području UŠP Bjelovar, potvrdila je kako je na stablu prisutna *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman (Slika 5.).

Klimatske prilike područja Bilogore između 2006. i 2007. godine značajnije su odstupale od prosječnih količina oborina, posebice u pogledu izmjena vrlo sušnih i vrlo vlažnih razdoblja. Slika 6 prikazuje odstupanja oborina od prosjeka 1961-1990. godine (DHMZ – Državni hidrometeorološki zavod). Prema podjeli DHMZ-a odstupanja se bilježe kao ekstremno sušno (p manje od 2), vrlo sušno (p 2-9), sušno (p 9-25), normalno (p 25-75), kišno (p 75-91), vrlo kišno (p 91-98) i ekstremno kišno (p veći od 98). Dok oborine u 2004. i 2005. godine nisu značajnije odstupale, u 2006. godini ljeto je bilo ekstremno sušno, kada se u lipnju bilježi gotovo ekstremna suša (p 4), a u srpnju vrlo sušno razdoblje (p 10). Do kraja vegetacijskog razdoblja stanje se normaliziralo, ali u proljeće 2007. ponovno slijedi izrazito

sušno razdoblje sa ekstremno sušnim travnjom, sušim svibnjom i vrlo sušnim lipnjom (Slika 6). Može se pretpostaviti kako je sušni period u dvije godine za redom bio posebno stresan za pojedina stabla bukve. U rujnu i listopadu 2007. godine slijedilo je ekstremno vlažno razdoblje (rujan), koji je uvelike pomogao brzom širenju spora pseudogljive, a posljedica odstupanja od prosjeka je velik broj napadnutih stabala u 2008. godini.

Pojava *P. cambivora* na bukvi na Bilogori, najvjerojatnije je rezultat izmjene izrazito sušnog razdoblja u

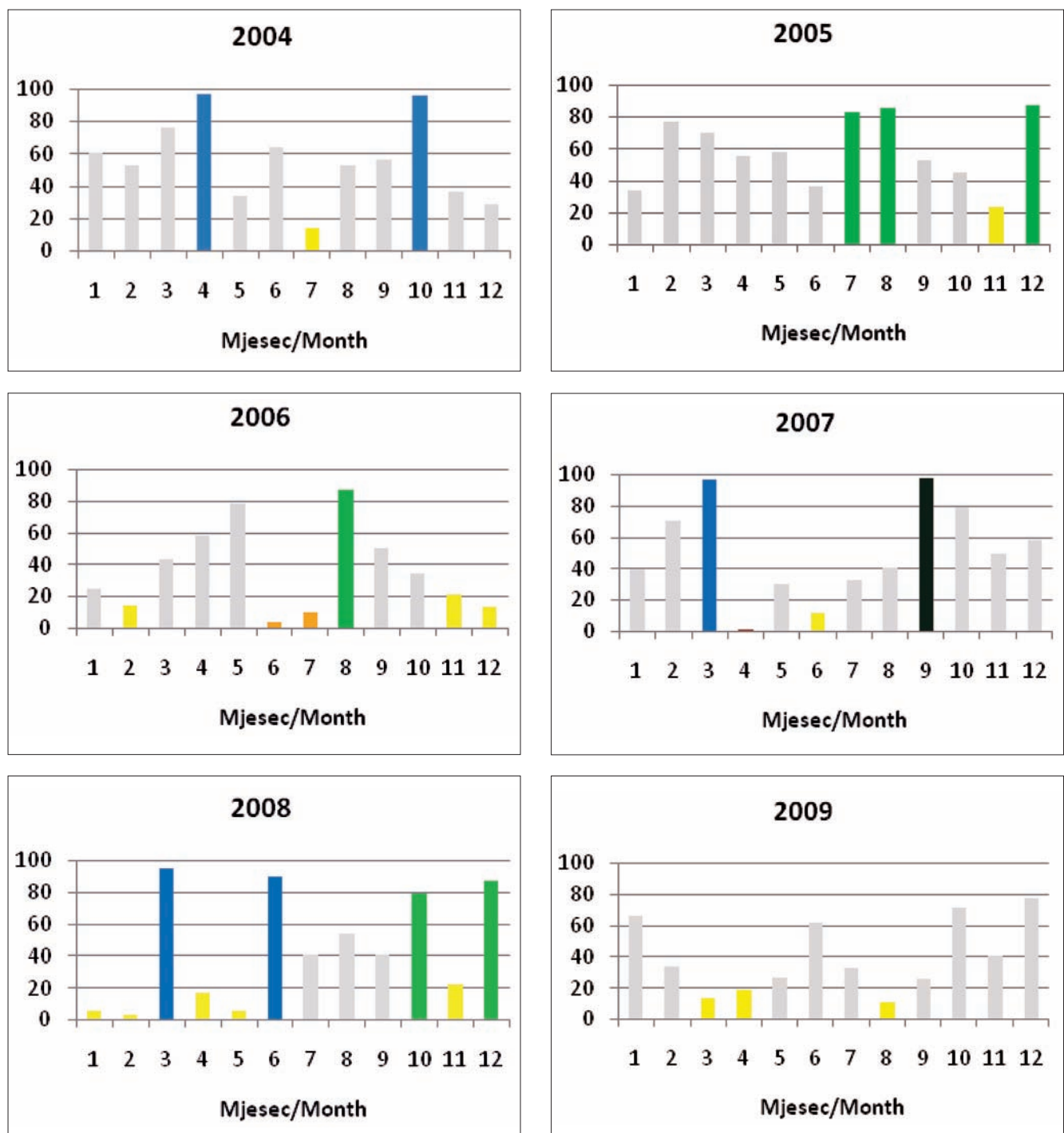
ITS1 PCR-SSCP



Slika 5. Rezultat molekularne analize *Phytophthora cambivora* za kolonije iz bukve Bjelovara (B41b1-B41b8)

Figure 5 Molecular analysis of *Phytophthora cambivora* on colonies taken from Beech in Bjelovar

2006. i 2007. i izrazito vlažnog krajem 2007. i početkom 2008. godine. Dok je suša fiziološki oslabila bukova stabla, izrazito kišna jesen 2007. godine stvorila je uvjete za širenje zoospora i zarazu finog korijena oslabljenih stabala. Kako je bukva vrsta osjetljiva na visoku vlagu, njezin obrambeni sustav bio je smanjen, te su se brzo razvili simptomi napada u obliku teklina, smanjenog lista i sušenja vrhova krošnji.



Slika 6. Odstupanje količine oborina (izraženo u percentilima) za Bjelovarsku bilogoru 2004–2009, (izvor: DHMZ; <http://meteo.hr/>)
 Figure 6 Deviation of precipitation (in percentile) in Bilogora between 2004–2009 (data source: DHMZ; <http://meteo.hr/>)

Na terenu su u 2008. godini uočeni natruli sušci bukve i hrasta, za tada, zbog natrulosti, jedva primjetljivim teklinama. Ta su stabla mogla biti izvor zaraze,

od kojih se napad proširio na čitav odjel. Da li se bolest počela širiti na taj način, ne može se više jasno utvrditi.

ZAKLJUČCI – Conclusions

Ekstremne klimatske prilike uz negativne antropogene utjecaje dovode do promjena stanišnih prilika u šumskim ekosustavima. Te promjene se negativno odražavaju na vitalnost stabala, a samim tim i na zdrav-

stveno stanje. Ukoliko te promjene istovremeno imaju pozitivan učinak na razvoj štetnih biotičkih čimbenika, može doći do pojava akutnih epidemija. Posljednjih nekoliko godina česta su klimatska odstupanja, sa fa-

zama izrazito sušnih do vrlo vlažnih razdoblja, što pogoduje razvoju, širenju i infekciji *Phytophthora* vrsta, posebice kada su u pitanju monokulture.

U istraživanju pseudogljive roda *Phytophthora* utvrđeno je sljedeće:

1. Na bukvi je nađena patogena vrsta *P. cambivora*,
3. *Phytophthora cambivora* je prouzročila sušenje bukve u jednom odjelu na 21 ha, a nastavljeno je u

drugim dijelovima UŠP Bjelovar, ali zbog provedenih zaštitnih mjera nije došlo do širenja na veće područja,

3. Dvije vrste *Phytophthora* nađene su u nasadima topola: *P. cambivora* i *P. ganopodyides*. Koliko je koja vrsta bila zastupljena, nije utvrđeno tijekom ovog istraživanja. One su prouzročile značajno sušenje topola u nasadima, gdje je većinom stradao klon 275/81.

ZAHVALA – Acknowledgment

Ovaj rad posvećujemo **Nadi Kušić**, višoj šumarskoj tehničarki u Hrvatskom šumarskom institutu. Od prvog dana projekta do svoje iznenadne smrti u proljeće 2010. godine, Nada Kušić je zdušno radila i obavljala laboratorijske analize na ovom specifičnom problemu i na evaluaciji *Phytophthora* vrsta. Svojim idejama, razmišljanjima te entuzijazmom kojim nas je znala zaraziti, zadužila je nas i druge istraživače da i dalje radimo na ovoj za šumarstvo važnoj temi.

Veliko hvala također dugujemo kolegama na terenu, Željki Bakran i Vojislavu Šušnjiću iz UŠP Bjelovar,

zatim Stanku Antunoviću, Stjepanu Vidakoviću, Draženu Košutiću i Daliboru Toncu iz UŠP Osijek.

Zahvaljujemo se Chuan Hongu iz Hampton Roads Agricultural Research and Extension Center, Virginia, SAD.

Rad na ovom članku financiran je sredstvima trgovačkog društva **Hrvatske šume d.o.o.** pod projektom "Istraživanje utjecaja *Phytophthora* na sušenje topola u nasadima".

LITERATURA – References

- Belbahri, L., E. Moralejo, G. Calmin, T. Oszako, J.A. Garcia, E. Descals, F. Lefort, 2006: *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland Microbiol. Lett. 261: 165–174.
- Brasier, C.M., 1993: *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in European oak declines. Tipolitografia Radio 49–57.
- Brasier, C.M., F. Robredo, J.F.P. Ferraz, 1993: Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant Path. 42: 140–145.
- Brasier, C.M., J.M. Rose, J. Gibbs, 1995: An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. Plant Path. 44: 999–1007.
- Brasier, C.M., 1999: *Phytophthora* Pathogens of Trees: Their Rising Profile in Europe. Forestry Commission publikation 1–6.
- Brasier, C.M., S.A. Kirk, J. Delcan, D.L. Cooke, T. Jung, W. Manint Veld, 2004: *Phytophthora alni* sp. Nov. And its variants: designation of a group of emerging heteroploid hybrid pathogens. Mycol. Res. 108: 1172–1184.
- Cooke, D.E.L., D.M. Kennedy, D.C. Guy, J. Russel, S.E. Unkles, J.M. Duncan, 1996: Relatedness of Group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. Mycol. Res. 100: 297–303.
- Cooke, D.E.L., J.M. Duncan, 1997: Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. Mycol. Res. 101: 667–677.
- Cooke, D.E.L., A. Drenth, J.M. Duncan, G. Wagers, C.M. Brasier, 2000: A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30: 17–32.
- Denman, S., S.A. Kirk, C.M. Brasier, J.F. Webber, 2005: *In vitro* leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK. Plant Pathology 54 (4): 512–521.
- Denman, S., S. Kirk, A. Whybrow, E. Orton, J.F. Webber, 2006: *Phytophthora kernoviae* and *P. ramorum*: host susceptibility to these pathogens and sporulation potential on foliage of susceptible trees. EPPO Bulletin 36(2): 373–376.
- Erwin, D.C., O.K. Ribeiro, 1996: *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, Minnesota, St. Paul: 1–562.
- Glavaš, M., 1999. Gljivične bolesti šumskog drveća, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 345 str., Zagreb.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kirk, B.C. Sutton, D.N. Pegler, 1995. Ainworth and Bisbys Dictionary of the fungi, 8th edn, CAB International, 988 str., Willingford, Oxon.
- Jung, T., H. Blachske, 1995: *Phytophthora* root rot in declining forest trees. U: H. Kraigher, F. Batic, D.E. Hanke, R. Agerer, D. Grill (ur.), Bioindica-

- tion of forest site pollution: Development of methodology and training, 153–157, Ljubljana.
- Jung, T., H. Blaschke, P. Neumann, 1996: Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Path.* 26: 253–272.
- Jung, T., D.E.L. Cooke, H. Blaschke, J.M. Duncan, W. Oßwald, 1999: *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* 103: 785–798.
- Jung, T., H. Blaschke, W. Oßwald, 2000: Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Path.* 49: 706–718.
- Jung, T., E.M. Hansen, L. Winton, W. Oßwald, C. Delatour, 2002: Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol. Res.* 106: 397–411.
- Jung, T., J. Nechwatal, D.E.L. Cooke, G. Hartmann, M. Blaschke, W. Oßwald, J.M. Duncan, C. Delatour, 2003: *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous species in Europe. *Mycol. Res.* 107: 772–789.
- Kong, P., C. Hong, P.A. Richardson, M.E. Gallego, 2003: Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 39: 238–249.
- Kong, P., P.A. Richardson, C. Hong, 2005: Direct colony PCR-SSCP for detection of multiple pythiaceae oomycetes in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 61: 25–32.
- Rizzo, D.M., M. Garbelotto, J.M. Davidson, G.M. Slaughter, S.T. Koike, 2002: *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205–214.
- Weste, G., G.C. Marks, 1987: The biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australian forests. *Annu. Rev. Phytopathol.* 97: 207–229.

SUMMARY: The genus *Phytophthora*, belongs to the Oomycota, parasitizes on many species of woody plants, causing decay of roots which is often followed by climatic extremes. *Phytophthora* spores can survive in soil for several years waiting for optimal conditions for germination, zoosporangium is formed, from which zoospores are released. The zoospores are chemotactic swimmers which actively find tree fine roots that become infected. The disease develops over a long number of years, but certain factors can significantly speed up the decline of trees. Bleeding lesions on the trunk (Figure 1–3), increasing of the amount of dead branches, and lack of lateral shoots are typical symptoms of *Phytophthora* infection which was registered on two different tree species in Croatia (*Fagus sylvatica* and *Populus x euroamericana*). The consequence was a reduction of surface of leaves or the decline of vitality, and ultimately death of the tree. Given the importance of the problem in the world, and the potential dangers of Croatian forests, the aim of this study was to determine the presence of *Phytophthora* species in Croatia, and to assess the threat of their expansion. Investigations were carried out in Bjelovar and Osijek area in beech and poplar euro-american clones (Table 1). Samples of bark and soil were taken from trees with clear symptoms of the disease, and analysed in the laboratory. Parts of the samples were transferred to culture media (PDA, V8), and molecular analysis of suspected isolates was performed (Figure 5). Soil samples were processed by immersing in water, and pears, young leaves of oak, rhododendron young leaves and fresh apples were used as baits. The obtained samples were processed by surface sterilization and placed on several types of culture media, as mentioned above. Obtained pure cultures (isolates) were analyzed by molecular techniques.

The results show that the presence of *P. cambivora* was confirmed on beech and *P. cambivora* and *P. ganopodyides* on poplar. The occurrence of *P. cambivora* is related to changes of extreme dry and wet periods (Figure 6). The results on poplars shows that clone 275/81 have been significantly damaged by species of *Phytophthora*.

Key words: *Phytophthora*, root decay, beech, poplar clone